

10.11.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年10月16日

出願番号  
Application Number: 特願 2003-356934  
[ST. 10/C]: [JP 2003-356934]

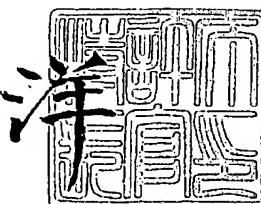
出願人  
Applicant(s): 株式会社ナード研究所

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

八月



出証番号 出証特 2004-3117048

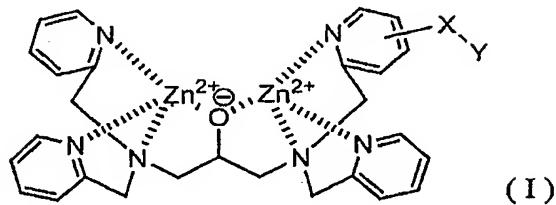
**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** 32617  
**【提出日】** 平成15年10月16日  
**【あて先】** 特許庁長官殿  
**【国際特許分類】** C07F 3/06  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 広島県広島市東区牛田東2丁目19-18  
**【氏名】** 小池 透  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 兵庫県尼崎市西長洲町2丁目6番1号 株式会社ナード研究所内  
**【氏名】** 川崎 昭彦  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 兵庫県尼崎市西長洲町2丁目6番1号 株式会社ナード研究所内  
**【氏名】** 小橋 達弘  
**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 000134637  
**【住所又は居所】** 兵庫県尼崎市西長洲町2丁目6番1号  
**【氏名又は名称】** 株式会社ナード研究所  
**【代理人】**  
**【識別番号】** 100067828  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 小谷 悅司  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100075409  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 植木 久一  
**【先の出願に基づく優先権主張】**  
**【出願番号】** 特願2003- 56068  
**【出願日】** 平成15年 3月 3日  
**【先の出願に基づく優先権主張】**  
**【出願番号】** 特願2003-113707  
**【出願日】** 平成15年 4月18日  
**【手数料の表示】**  
**【予納台帳番号】** 012472  
**【納付金額】** 21,000円  
**【その他】** 国の委託に係る研究の成果に係る特許出願（平成13年度、経済産業省、平成13年度即効型地域新生コンソーシアム研究開発事業（フォスタグ技術と商品の開発））  
**【提出物件の目録】**  
**【物件名】** 特許請求の範囲 1  
**【物件名】** 明細書 1  
**【物件名】** 図面 1  
**【物件名】** 要約書 1  
**【包括委任状番号】** 9709342

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

式(I)で表わされる錯体化合物によって、リン酸化ペプチドを標識することを特徴とする方法。

## 【化1】



[式中、Xは結合基を示し、Yは標識基を示す。]

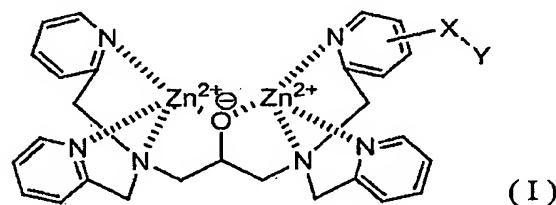
## 【請求項2】

上記錯体化合物として、上記標識基がビオチンである化合物を用いる請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

式(I)で表わされる錯体化合物。

## 【化2】



[式中、Xは結合基を示し、Yは標識基を示す。]

## 【請求項4】

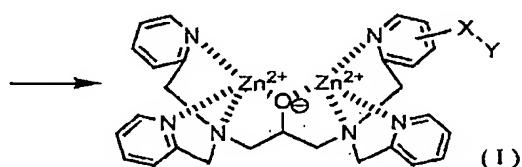
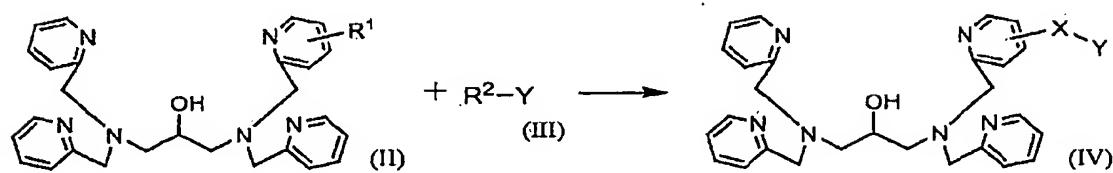
上記標識基がビオチンである請求項3に記載の錯体化合物。

## 【請求項5】

スキーム1を含むことを特徴とする化合物(I)の製造方法。

## 【スキーム1】

## 【化3】

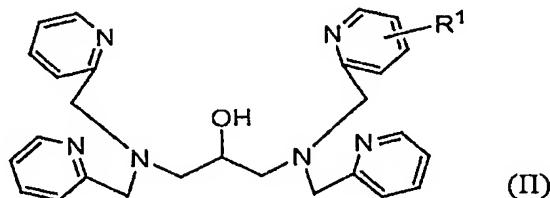


[式中、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>は、結合基Xを形成するための反応性基を示し、Yは標識基を示す。]

【請求項6】

式(II)で表わされる化合物。

【化4】



[式中、R<sup>1</sup>は反応性基を示す。但し、アミノメチル基、ヒドロキシメチル基、アミノ基およびカルボキシル基を除く。]

【書類名】明細書

【発明の名称】リン酸化ペプチドの標識方法、該方法に使用される錯体化合物、該錯体化合物の製造方法、および該錯体化合物の原料化合物

【技術分野】

【0001】

本発明は、リン酸化ペプチドを標識する方法、当該方法に使用可能な錯体化合物、当該錯体化合物の製造方法、および当該製造方法の原料化合物として使用可能な化合物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ある種の生体内酵素は、活性中心を代表とする特定部位にセリンやトレオニン、チロシン残基を有し、これらの水酸基が、キナーゼと呼ばれる酵素によりリン酸化されたり或いは脱リン酸化されることによって、酵素活性が調節されている。また、リシン、アルギニン、ヒスチジンの窒素や、アスパラギン酸、グルタミン酸のカルボキシル基がリン酸化（または脱リン酸化）されることによって、活性が調節されている酵素もある。

【0003】

この様なリン酸化一脱リン酸化により調節されている代謝系としては、グリコーゲン合成の抑制とその分解系がよく知られている。この代謝系は、主としてリン酸化一脱リン酸化によりカスケード制御され、調節されている。

【0004】

そして近年、このリン酸化一脱リン酸化が、疾病に関する代謝系において重要な役割を有していることが明らかとなってきた。

【0005】

例えば、細胞のガン化は、リン酸化一脱リン酸化の異常が一因であるといわれている。つまり、細胞周期の進行や停止は様々な酵素（タンパク質）のリン酸化（または脱リン酸化）により制御されており、このリン酸化にはサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ（CDK）が関与しているが、斯かるメカニズムが損傷するとリン酸化（または脱リン酸化）に乱れが生じ、その結果、細胞の異常増殖が引き発されることになる。

【0006】

その他にも、プロテインキナーゼCが、アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー疾患の原因となるヒスタミンの脱顆粒に関与することや、アルツハイマー病患者の脳で発生する神経原纖維変化は、リン酸化されたタウタンパク質によることが明らかにされている。

【0007】

従って、タンパク質のリン酸化一脱リン酸化状況を把握することは、生体組織細胞遺伝子の発現を探索したり、酵素活性評価のみならず、疾病の診断や治療にも役立つ可能性がある。

【0008】

ところが、従来より用いられてきたリン酸化タンパク質（または脱リン酸化タンパク質）の特定方法には、様々な欠点がある。

【0009】

例えば、酵素免疫法は、対象となるタンパク質試料が微量であっても分析可能という利点があるが、必要な抗体を充分量得ることが困難であり、また、対象タンパク質が数kD a以下である場合には、タンパク質中のリン酸化部位に結合する抗体を調製することができない。

【0010】

また、放射性同位元素<sup>32</sup>Pで標識されたリン酸を使用することによって、タンパク質への特異的結合を検出する方法も考えられるが、放射性同位元素の取扱いには当然に注意が必要であり、廃液の管理や処理まで要求される。

【0011】

更に、リン酸化タンパク質と脱リン酸化タンパク質とでは電荷が異なることから、二次元電気泳動法の応用も考えられる。しかし、特に生体試料を分析する場合には、試料に多種類のタンパク質が含まれていることから、スポットの特定が非常に困難である。それに加え、このスポット特定のために放射性同位元素を用いるとすれば、前述した問題が生じてくる。

【0012】

ところで、非特許文献1には亜鉛錯体が記載されており、当該亜鉛錯体は、二つの亜鉛イオンがジヌクレオチド中のリン酸基（リン酸ジエステル基）に作用し、切断するという機能を有する。しかし、非特許文献1における当該錯体の機能はあくまで触媒としてのものであり、リン酸基との配位結合能に関しては、一切記載されていない。実際、本発明者らによる実験によれば、当該錯体と2つのヌクレオチド間のリン酸基（リン酸ジエステル基）との解離定数は非常に高い。即ち、リン酸ジエステル基に対する当該錯体の配位結合能は低い。

【0013】

また、非特許文献2にも、上記亜鉛錯体と類似の構造を有する鉄錯体が記載されている。しかし、当該鉄錯体は、酸素分子の運搬タンパク質であるヘムエリトリン（hemerythrin）のモデルとして合成されたものであり、当該鉄錯体とリン酸基との配位結合能に関して全く記載も示唆もされていないことは、上記非特許文献1と同様である。

【非特許文献1】ヤシロ・モリオ、他2名、「Preparation and Study of Dinuclear Zinc(II) Complex for the Efficient Hydrolysis of the Phosphodiester Linkage in a Diribonucleotide」、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティ・ケミカル・コミュニケーションズ（Journal of the Chemical society, Chemical communications），p. 1793-1794（1995年）

【非特許文献2】ヒデカズ・アリイ、他6名、「A novel diiron complex as a functional model for hemerythrin」、ジャーナル・オブ・インオーガニック・バイオケミストリー（Journal of Inorganic Biochemistry），第82巻，p. 153-162（2000年）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

上述した状況の下、本発明が解決すべき課題は、リン酸化ペプチド（タンパク質）を容易に検出すべく、これを標識する方法を提供することにある。

【0015】

これに加えて、本発明では、リン酸化ペプチドに対して優れた配位結合能を有し、上記方法に使用できる化合物、その製造方法、およびその原料化合物を提供することも目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0016】

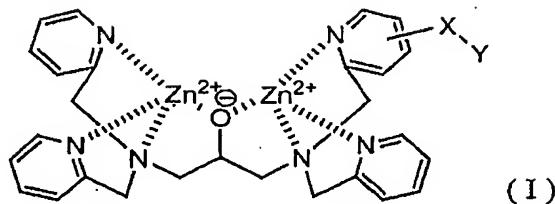
本発明者らは、上記課題を解決すべく、タンパク質に結合したリン酸基（リン酸モノエ斯特ル基）に配位可能な金属錯体について鋭意研究を進めたところ、本発明の化合物は、リン酸イオン或いはリン酸モノエ斯特ル中の2つの水酸基に対する配位結合能が極めて高く、その結果、ペプチドへ結合したリン酸基（リン酸モノエ斯特ル基）へ強く配位して、多数のペプチドを含んだ混合試料でもリン酸化ペプチドへ特異的に結合して複合体を形成することができ、また、本発明の化合物は標識基を有していることから、当該複合体を容易に特定できることを見出して本発明を完成した。

【0017】

即ち、本発明に係る方法は、式（I）で表わされる錯体化合物によりリン酸化ペプチドを標識することを特徴とする。

【0018】

## 【化1】



## 【0019】

[式中、Xは結合基を示し、Yは標識基を示す。]

従って、上記式(I)で表わされる錯体化合物は、リン酸化ペプチドへ特異的に結合して複合体を形成することができ、且つ標識基を有していることから当該複合体を容易に特定できるものとして、特に生化学的研究や病気の診断治療において非常に有用である。

## 【0020】

また、上記方法においては、上記錯体化合物として標識基がビオチンである化合物を用いることが好ましい。取扱いが容易であり、また、様々な発色反応を応用できることから利便性が高く、リン酸化ペプチドを容易に特定できるからである。

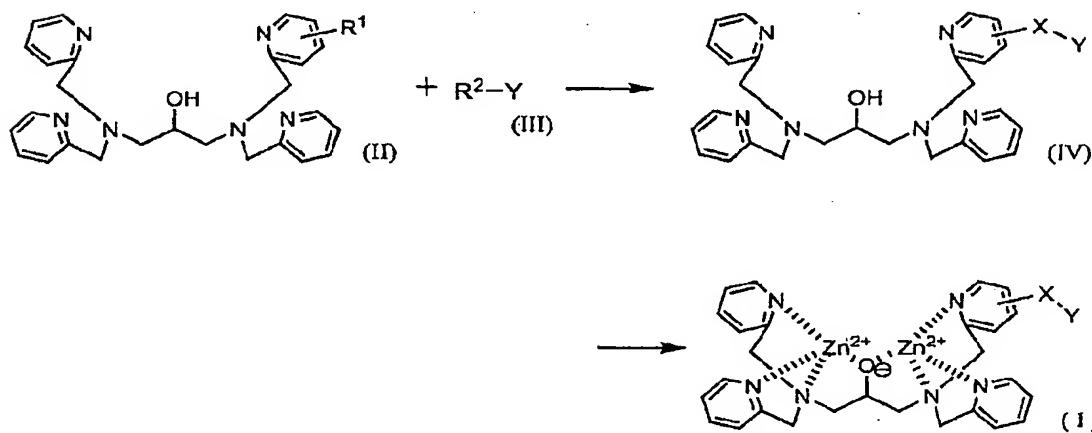
## 【0021】

上記式(I)で表わされる錯体化合物は、スキーム1を含むことを特徴とする方法によって容易に製造することができる。

## 【スキーム1】

## 【0022】

## 【化2】



## 【0023】

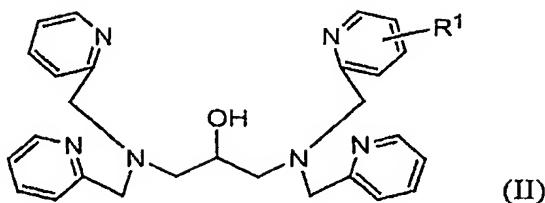
[式中、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>は、結合基Xを形成するための反応性基を示し、Yは標識基を示す。]

## 【0024】

また、式(II)で表わされる化合物は、上記スキーム1に使用されるものとして、即ち、上記式(I)で表わされる錯体化合物の製造原料化合物として有用である。

## 【0025】

## 【化3】



## 【0026】

[式中、R<sup>1</sup>は反応性基を示す。但し、アミノメチル基、ヒドロキシメチル基、アミノ基およびカルボキシル基を除く。]。

## 【発明の効果】

## 【0027】

本発明に係るリン酸化ペプチドの標識方法は、リン酸化ペプチド（タンパク質）を容易に検出することができる。従って、生体試料等に本発明方法を適用することによって、病気の診断等に応用でき得る点で非常に有用である。

## 【0028】

また、本発明に係る化合物は、リン酸化ペプチドに対して従来にない配位結合性を示すことから、上記方法で使用できる化合物として有用である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0029】

本発明方法が享有する最大の特徴は、標識基を有する式(I)の錯体化合物を特異的にリン酸化ペプチドと結合させ複合体を形成させることによって、リン酸化ペプチドを容易に特定できることにある。

## 【0030】

即ち、従来、リン酸基と結合できる金属錯体は種々知られていたものの、式(I)に類似の化合物で且つ標識基を有するものはなかった。そこで、本発明者らは、式(I)の錯体化合物を用いれば、複数のペプチドが含まれている生体試料中でも、極めて容易にリン酸化ペプチドを検出し特定できることを見出し、本発明を完成したものである。

## 【0031】

以下に、本発明に係るリン酸化ペプチドを標識する方法を例示する。

## 【0032】

先ず、対象となる組織細胞から、その細胞を構成する実質的に全てのペプチドを含む試料を調製する。この調製は、生化学分野で一般的に用いられている方法により行なうことができる。

## 【0033】

次に、当該試料に含まれるペプチドを分離する。この分離方法は特に制限なく一般的なものを使用できるが、例えば電気泳動を用いればよい。

## 【0034】

電気泳動を使用する場合、泳動後ゲルを式(I)の錯体化合物の溶液に浸漬してリン酸化ペプチドを標識し、標識基の種類に応じた検出方法を用いて、リン酸化ペプチドを特定することができる。

## 【0035】

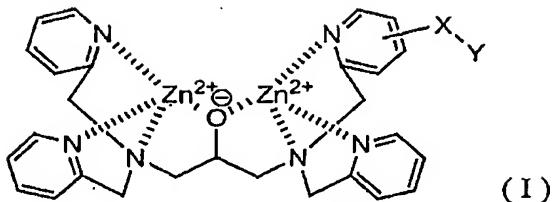
式(I)の錯体化合物溶液に使用できる溶媒は、リン酸化ペプチドの検出を阻害しないものであれば特に制限されないが、例えば水（緩衝液やその他の塩溶液を含む）；メタノール、エタノール等のアルコール；これらの混合溶媒を挙げることができる。好適には、水系溶媒を使用する。主としてペプチドを変性させないことによる。

## 【0036】

次に、上記方法に用いられる化合物(I)について説明する。

## 【0037】

## 【化4】



## 【0038】

[式中、Xは結合基を示し、Yは標識基を示す。]

上記式(I)において、配位金属としてZnを選択した理由は、リン酸化タンパク質のリン酸基(リン酸モノエステル基)への配位能が極めて高いことによる。

## 【0039】

「結合基」とは、式(I)の化合物中、主骨格と標識基とを結合する基であり、化合物(I)の製造を容易にしたり、また、化合物(I)とペプチドに結合したリン酸基との配位を標識基が阻害しない様にする作用を有する。従って、化合物(I)の製造において、標識基が主骨格に直結した原料化合物の入手が容易であったり、標識基が比較的小さくリン酸基への配位が阻害されない場合には、「結合基」は、主骨格と標識基を直結する単なる共有結合であってもよい。

## 【0040】

「結合基」としては、前述した作用を有するものであれば特に限定されないが、例えばC1-C6アルキレン基、アミノ基(-NH-)、エーテル基(-O-)、チオエーテル基(-S-)、カルボニル基(-C(=O)-)、チオニル基(-C(=S)-)、エステル基、アミド基、ウレア基(-NH<sub>2</sub>C(=O)NH-)、チオウレア基(-NH<sub>2</sub>C(=S)NH-)；アミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基からなる群より選択される基を一端に有するC1-C6アルキレン基；アミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基からなる群より選択される同一または異なる基を両端に有するC1-C6アルキレン基；およびアミノ基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基、チオニル基、エステル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基およびC1-C6アルキレン基からなる群より選択される2以上の基が直線状に結合された基を挙げることができる。

## 【0041】

ここで、「C1-C6アルキレン基」とは、炭素数1～6の直鎖状または分枝鎖状の2価脂肪族炭化水素基をいい、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、テトラメチレン、ヘキサメチレン、メチルエチレン、メチルプロピレン、ジメチルプロピレン等を挙げることができ、C1-C4アルキレン基が好ましく、C1-C2アルキレン基がより好ましい。

## 【0042】

本発明における「標識基」は、生化学分野で一般的に使用されるものであれば特に制限はないが、取扱いの面から放射性同位元素を含むものは好ましくない。この様な「標識基」としては、例えば蛍光発色基、ニトロオキシドラジカル含有基、ビオチン等を挙げることができる。

## 【0043】

「蛍光発色基」は、比較的長波長の蛍光を安定的に発色し得る置換基をいい、水溶性、脂溶性を問わず、生化学分野で一般的に使用されるものを特に制限なく用いることができる。その様な「蛍光発色基」としては、例えばアミノメチルクマリン誘導体、フルオロセイン誘導体、テトラメチルローダミン誘導体、アントラニロイル誘導体、ニトロベンゾキサジアオール誘導体、ジメチルアミノフタレン誘導体を挙げることができる。

## 【0044】

「ニトロオキシドラジカル含有基」は、安定したラジカルを有する基であり、電子スピ

ン共鳴（E S R）によって、リン酸化ペプチドを検出可能にするものである。つまり、生体分子は通常不対電子を有しないので電子スピン共鳴を示さないが、化合物（I）が配位したペプチドは電子スピン共鳴を示すので、リン酸化ペプチドを特定することができる。

【0045】

「ビオチン」は、卵白由来のアビジンと放線菌由来のストレプトアビジンに対して、特異的で且つ強い親和性を有している。従って、標識基としてビオチンを有する化合物にアビジンまたはストレプトアビジンを結合させ、更にビオチン化した酵素を作用させれば、ビオチンおよびアビジン等を介して、本発明の錯体化合物と酵素とを特異的に結合させることができ。そして、当該酵素としてアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等を用い、各酵素に応じた発色試薬を作用させれば、リン酸化ペプチドを特定することができる。例えば、酵素としてアルカリホスファターゼを結合させ、発色試薬としてニトロブルーテトラゾリウムと5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を用いて数時間反応させると、リン酸化したペプチドは紫色に発色するので、これにより特定される。また、ローダミン等の蛍光色素で標識されたストレプトアビジンも市販されており、これを使用すれば、通常の蛍光画像解析法でリン酸化ペプチドを特定できる。

【0046】

また、ストレプトアビジンの結合したアガロースゲルも市販されており、これに標識基としてビオチンを有する本発明の錯体化合物を作用させると、本発明の錯体化合物と結合したアガロースゲルを生成させることができる。このアガロースゲルに試料混合物を作用させると、リン酸化ペプチドを選択的に吸着することが可能となる。その後、リン酸緩衝液など本錯体化合物とリン酸化ペプチドを脱着できる条件を作用させると、リン酸化ペプチドのみを得ることができる。即ち、この様なアガロースゲルを用いれば、電気泳動法によらなくても、リン酸化ペプチドの精製や濃縮が可能となる。同様にストレプトアビジンの結合した磁気ビーズも発売されており、これを用いてリン酸化ペプチドの精製や濃縮が可能となる。更に、表面プラズモン共鳴（S P R）測定用のプレートとしてストレプトアビジンの結合したプレートが市販されており、これと標識基としてビオチンを有する本発明の錯体化合物を作用させると、本錯体化合物の結合した表面プラズモン共鳴（S P R）測定用のプレートとなる。これを用いて未知試料の表面プラズモン共鳴（S P R）を測定することによって、未知試料中のリン酸化ペプチドの有無を特定できる。

【0047】

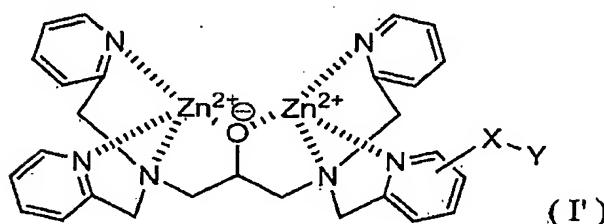
尚、化合物（I）の化合物では、本発明と同一の作用効果を享有するものとして、ピリジン環にメチル基等を導入することも可能であるが、この様な均等化合物も本発明の範囲内に含まれるものとする。

【0048】

また、本発明に係る化合物における（-X-Y）基の位置も特に限定されず、下記化合物（I'）に示す位置に存在する場合もある。

【0049】

【化5】



【0050】

この化合物（I'）と化合物（I）は全く等価であり、合成で何れの化合物となるかは必ずしも明らかではないが、実際には両者の混合物であると考えられ、勿論、化合物（I'）も本発明の範囲内に含まれる。

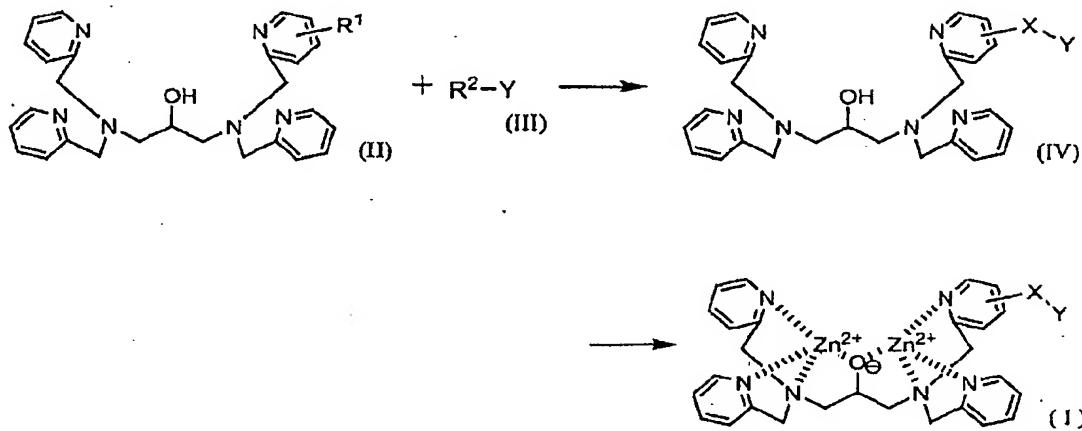
## 【0051】

上記式 (I) で表わされる錯体化合物は、スキーム 1 を含むことを特徴とする方法によつて容易に製造することができる。

## [スキーム 1]

## 【0052】

## 【化6】



## 【0053】

[式中、X およびYは前述したものと同義を示す。また、 $R^1$  と  $R^2$  は、結合基Xを形成するための反応性基を示す。]。

## 【0054】

上記スキームにおいては、先ず、反応性基  $R^1$  と  $R^2$  を反応させて主骨格に結合基Xを介して標識基Yを導入する。

## 【0055】

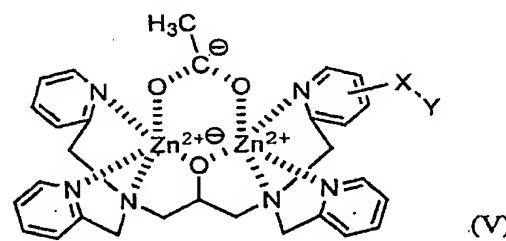
従つて、 $R^1$  と  $R^2$  の種類や溶媒、反応温度、その他の試薬、精製方法等は、主としてXの種類により決定される。例えば、アミノ基（第二級または第三級アミノ基）を介して標識基が導入される場合には、 $R^1$  と  $R^2$  の組合せとしては末端にアミノ基（第一級アミノ基）を有する基とハロゲン原子等の脱離基との組合せを挙げることができる。この場合の一般的な反応条件は、溶媒中塩基の存在下で両化合物を縮合することが挙げられる。また、 $R^1$  が活性基であれば、標識基の導入は非常に容易である。

## 【0056】

次に、化合物 (IV) の溶液に金属塩を添加することによって、化合物 (I) を得ることができる。例えば硝酸亜鉛 (II) や酢酸亜鉛(II)を添加すればよいが、酢酸亜鉛(II)を添加する場合には、一旦酢酸が配位した以下の化合物が得られる。

## 【0057】

## 【化7】



## 【0058】

この化合物は、化合物 (I) よりも安定であり保存に便利であるが、化合物 (I) と等

価なものであり、化合物(I)と同様に用いることができる。即ち、ペプチド混合物中に上記化合物を加えるとリン酸モノエステル基が酢酸と交換的に配位するため、リン酸化ペプチドを検出することができる。

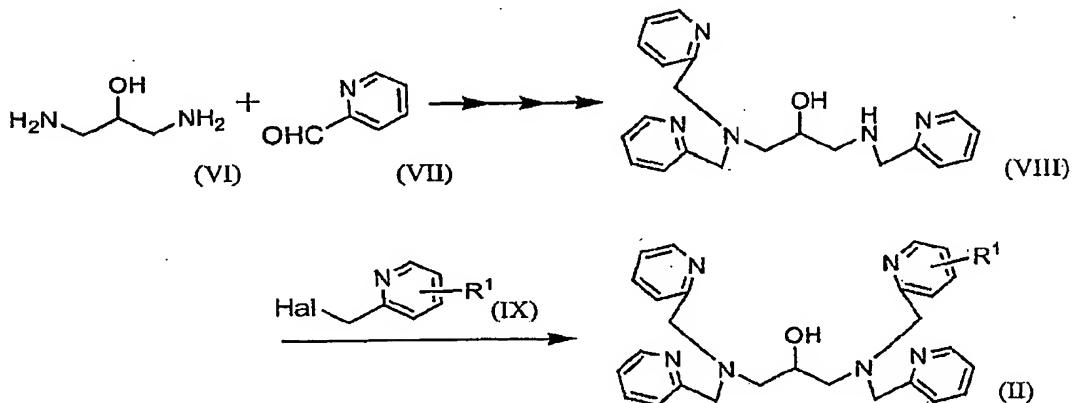
## 【0059】

化合物(I)の原料化合物である化合物(II)は、以下のスキーム2により合成することができる。

## [スキーム2]

## 【0060】

## 【化8】



## 【0061】

[式中、R<sup>1</sup>は前述したものと同義を示す。また、“Hal”は、ハロゲン原子を示し、好適には臭素原子を示す。]

原料化合物である化合物(VI) (1,3-ジアミノ-2-プロパノール)は、市販のものを使用することができる。また、化合物(VII)と化合物(IX)は比較的簡単な構造を有しているので、市販のものを用いるか、或いは当業者公知の方法により合成することができる。

## 【0062】

スキーム2では、先ず、触媒の存在下に化合物(VI)と(VII)を縮合反応させて、化合物(VIII)を得る。本反応は一段階ずつ化合物(VII)を導入していくてもよいが、3当量以上の化合物(VII)を使用することによって一段階反応で化合物(VIII)を得ることもできる。

## 【0063】

スキーム2では、縮合反応として還元的アミノ化反応を行なっている。その場合に使用される溶媒は、化合物(VI)と(VII)とを実質的に溶解でき、反応を阻害しないものであれば特に制限なく使用することができるが、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール等のアルコール類；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類；水；又はこれらの混合溶媒を使用することができる。

## 【0064】

還元的アミノ化反応では、先ず化合物(VI)と(VII)を触媒としての濃塩酸存在下に縮合した後、一般的な還元試薬により還元することができる。

## 【0065】

反応温度と反応時間は、原料化合物の種類等によって好適な条件を採用すればよいが、例えば20～80℃で12～100時間反応させる。

## 【0066】

反応終了後は、溶媒等を減圧留去した後に水を加え、非水溶性溶媒で抽出し、油相を無水硫酸マグネシウム等で乾燥した後、溶媒を減圧留去する。次いで、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー等の公知方法により精製して、化合物(VIII)を得ることができる。

きる。

【0067】

尚、化合物 (VIII) を得る方法はスキーム 2 で示した方法に限られず、例えば化合物 (VI) とハロゲン化合物から化合物 (VIII) を合成してもよい。

【0068】

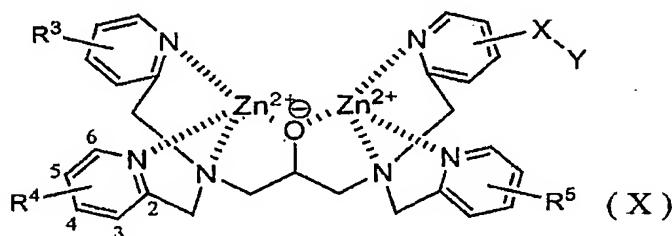
次に、化合物 (IX) を反応させることにより、化合物 (II) を得ることができる。この反応は、一般的な三級アミンの合成反応を採用することができる。例えば、溶媒中塩基の存在下で縮合させる。また、当該ステップにおいては、R<sup>1</sup> の種類に応じて、適宜保護基の導入と脱保護を行なってもよい。

【0069】

本発明に係る方法に使用できる化合物としては、錯体化合物 (I) の代わりに、下の錯体化合物 (X) を用いることもできる。

【0070】

【化9】



【0071】

[式中、X, Y は前述したものと同義を示す。また、R<sup>3</sup> ~ R<sup>5</sup> は、ピリジン環上の 4 または 6 位における電子供与性置換基を示す。]。

【0072】

本発明方法に使用される錯体化合物 (X) は、適切な置換位置に導入された電子供与性置換基によってピリジン窒素が電気的にリッチとなっているため、亜鉛に対する配位性に優れており、結果的に製造が容易であり、また、安定性を有する。

【0073】

錯体化合物 (X) の使用方法、製造方法、原料化合物については、錯体化合物 (I) に準ずるものを使用することができる。

【0074】

以下に、製造例および試験例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

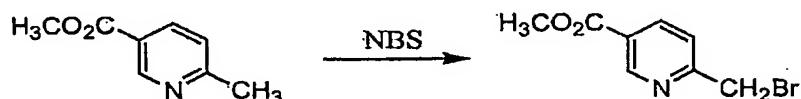
【実施例】

【0075】

(製造例 1-1) 6-プロモメチルニコチン酸メチル

【0076】

【化10】



【0077】

6-メチルニコチン酸メチル 50g (331mmol) の四塩化炭素 (625ml) 溶液にN-ブロモコハク酸イミド 59g (331mmol) を加えた。更に過酸化ベンゾイル 1.0gを添加後、投光器で光を照射しながら 40 ~ 50 °Cで 24 時間反応させた。

【0078】

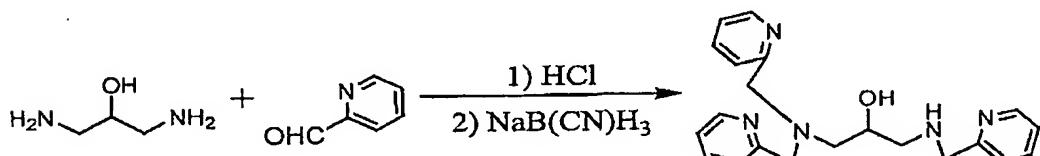
反応液を冷却後、析出した結晶を濾別し、濾液を炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し後に濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し、37gの目的物を得た。  
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ 3.96(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.58(2H, s, CH<sub>2</sub>Br), 7.54(1H, d, py), 8.30(1H, dd, py), 9.17(1H, d, py)。

## 【0079】

(製造例 1-2) N,N,N'-トリ(2-ピリジルメチル)-1,3-ジアミノプロパン-2-オール

## 【0080】

【化11】



## 【0081】

1,3-ジアミノプロパン-2-オール 32.6g (362mmol) のメタノール (2400ml) 溶液に濃塩酸 60ml を加え、更に 2-ピリジンアルデヒド 116.3g (1.09mol) を滴下した後、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム 50.16g (798mmol) を添加した。添加終了後、室温で 3 日間反応させた。

## 【0082】

反応液に濃塩酸を加えて pH 6 に調整した後、ある程度濃縮し、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7 に調整し、クロロホルムで抽出した。当該クロロホルム層を集め、乾燥した後に濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し、34g の目的物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ 2.59-2.83(4H, m, CH<sub>2</sub>), 3.86-4.01(7H, m, NCH<sub>2</sub>py, CH), 7.15(3H, dd, py), 7.23-7.32(3H, m, py), 7.56-7.65(3H, m, py), 8.53(3H, dd, py)

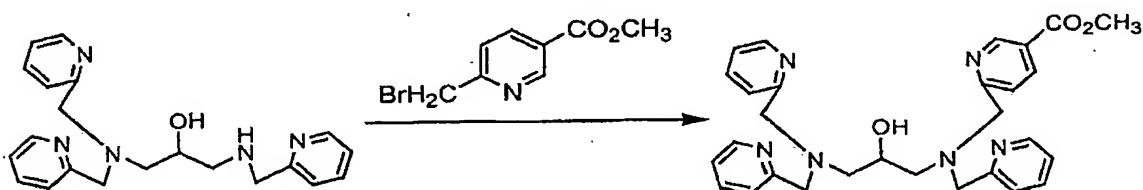
。

## 【0083】

(製造例 1-3) N,N,N'-トリ(2-ピリジルメチル)-N'-(5-メトキシカルボニル-2-ピリジルメチル)-1,3-ジアミノプロパン-2-オール

## 【0084】

【化12】



## 【0085】

製造例 1-2 で得た N,N,N'-トリ(2-ピリジルメチル)-1,3-ジアミノプロパン-2-オール 18.2g (50mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド (150ml) 溶液に炭酸カリウム 13.8g (100mmol) を加え、製造例 1-1 で得た 6-プロモメチルニコチン酸メチル 11.5g (50mmol) の乾燥ジメチルホルムアミド (75ml) 溶液を滴下し、滴下後、50℃で 1 時間反応させた。

## 【0086】

反応後、溶液を冷却した後、750ml の水に投入して 1N 塩酸で pH 8 に調整した。酢酸エチルで抽出後、酢酸エチル層を集め、水、飽和食塩水で洗浄した後に濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し、21.5g の目的物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ 2.58-2.73(4H, m, CH<sub>2</sub>), 3.83-3.95(12H, m, OCH<sub>3</sub>, NCH<sub>2</sub>py, CH), 7.10-7.14(3H, m, py), 7.34(3H, d, py), 7.50-4.60(4H, m, py), 8.17(1H, dd

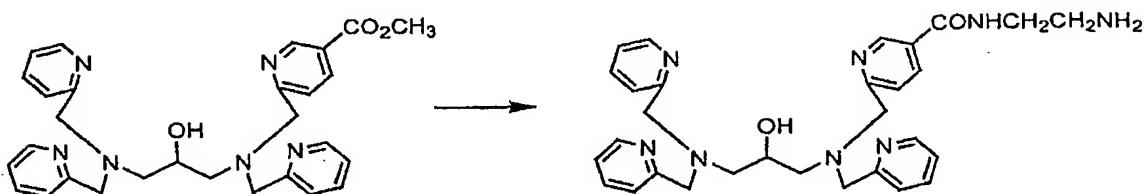
, py), 8.50(3H, d, py), 9.09(1H, d, py)。

[0087]

(製造例 1-4) N,N,N'-トリ(2-ピリジルメチル)-N'-(5-N'-{(2-アミノエチル)カルバモイル}-2-ピリジルメチル]-1,3-ジアミノプロパン-2-オール

[0 0 8 8]

[化 1 3 ]



[0089]

製造例 1-3 で得たN,N,N'-トリ(2-ピリジルメチル)-N'-(5-メトキシカルボニル-2-ピリジルメチル)-1,3-ジアミノプロパン-2-オール 9.7g (18.9mmol) のメタノール (100ml) 溶液にエチレンジアミン 22.7g (378mmol) を滴下し、滴下後、室温で3日間反応させた。

[0 0 9 0]

反応後、溶液を濃縮し、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し、9.72gの目的物を得た。

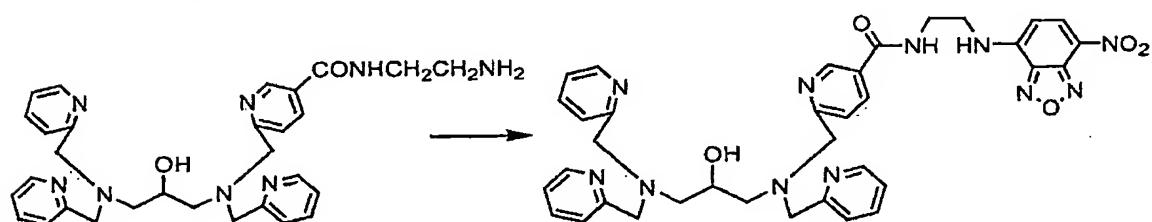
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  2.54-2.71(4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.94(2H, t, CH<sub>2</sub>N), 3.49(2H, d, t, CH<sub>2</sub>N), 3.80-3.99(9H, m, NCH<sub>2</sub>py, CH), 7.12(3H, ddd, py), 7.35(3H, d, py), 7.45(1H, d, py), 7.58(3H, ddd, py), 8.02(1H, dd, py), 8.49(3H, ddd, py), 8.89(1H, d, py)。

[0091]

(製造例 1-5)

(卷之二)

[化 1 4 ]



[0093]

製造例 1-4 で得た  $N,N,N'$ -トリ(2-ピリジルメチル)- $N'$ -[5-N''-(2-アミノエチル)カルバモイル-2-ピリジルメチル]-1,3-ジアミノプロパン-2-オール 200mg (0.37mmol) のアセトニトリル (20ml) 溶液に、炭酸水素ナトリウム 336mg (4.0mmol)、続いて4-クロロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール 73.8mg (0.37mmol) を添加し、室温で 2 時間反応させた。

【0094】

反応後、溶液を濃縮し、ジクロロメタン50mlと水50mlを加え分液し、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、得られた残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し、71.2mgの目的物を得た。

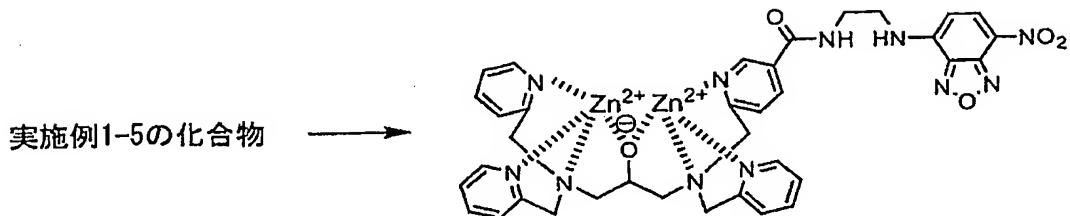
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ 2.46–2.69(4H, m, CH<sub>2</sub>), 3.65–3.95(13H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>py, CH), 6.06(1H, d, Ar), 7.08–7.13(3H, m, py), 7.32(3H, d, py), 7.42(1H, d, py), 7.56(3H, ddd, py), 7.96(1H, dd, py), 8.44–8.48(3H, m, py), 8.19(1H, d, Ar), 8.83(1H, d, py)。

【0095】

(製造例 1-6) 本発明に係る亜鉛錯体溶液

【0096】

【化15】



【0097】

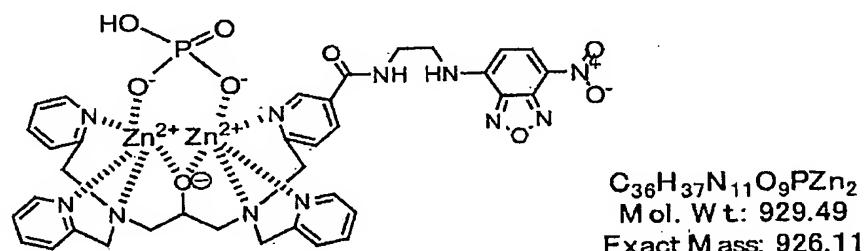
上記実施例1-5で合成した化合物を濃度50 $\mu$ Mの水溶液とし、2倍モルの硝酸亜鉛を加えて本発明に係る亜鉛錯体溶液を調製した。

【0098】

また、亜鉛錯体の存在を次の方法によって確認した。即ち、上記実施例1-5で合成した化合物をリン酸緩衝液 (pH = 6.86) に溶解して濃度50 $\mu$ M溶液とし、2倍モルの硝酸亜鉛を加えた。この溶液中で、本発明に係る亜鉛錯体は下に示す構造を有しており、これをMALDI-TOFマススペクトルによって確認した。

【0099】

【化16】



【0100】

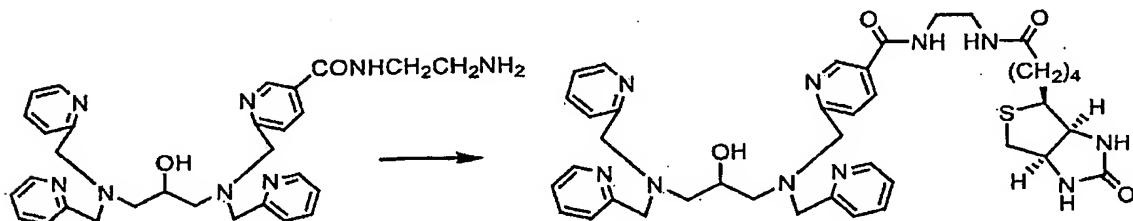
MALDI-TOFマススペクトルの結果を、図1として示す。図1中、分子イオンピークが926.22 (exact mass:926.11) として観測され、また、910.24のピークは、オキサジアゾール基の酸素が脱離したピークと考えられる。

【0101】

(製造例 2-1)

【0102】

【化17】



【0103】

D-ビオチン 137mg (0.56mmol) のジメチルホルムアミド (10ml) 溶液に、1,1'-カルボ  
出証特 2004-3117048

ニルジイミダゾール 116mg (0.72mmol) を添加し、室温で12時間反応させた。その後、反応液を氷冷し、製造例1-4で得たN,N,N'-トリ(2-ピリジルメチル)-N'-[5-N'-(2-アミノエチル)カルバモイル-2-ピリジルメチル]-1,3-ジアミノプロパン-2-オール 260mg (0.48mmol) のジメチルホルムアミド (3ml) 溶液を滴下し、冷却浴を外して室温で2時間反応させた。

## 【0104】

反応終了後、反応液を水 50mlに投入し、クロロホルム 50mlで2回抽出した。クロロホルム層を濃縮して得られた粗製品をカラムクロマトグラフィーで精製し、265mgの目的物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ 1.27-1.47(2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.50-1.75(4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.13-2.26(2H, m, COCH<sub>2</sub>), 2.52-2.74(5H, m, NCH<sub>2</sub>, SCH<sub>2</sub>), 2.79-2.88(1H, m, SCH<sub>2</sub>), 3.01-3.12(1H, m, SCH), 3.43-3.65(4H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.80-4.02(9H, m, NCH<sub>2</sub>Py, CHO), 4.22-4.28(1H, m, NCH), 4.42-4.49(1H, m, NCH), 5.83(1H, bs, NHCO), 6.60(1H, bs, NHCO), 7.07-7.18(3H, m, Py), 7.31-7.38(3H, m, Py), 7.44(1H, d, Py), 7.59(3H, ddd, Py), 8.03(1H, dd, Py), 8.15(1H, bs, NHCO), 8.42-8.58(3H, m, Py), 8.94(1H, d, Py)。

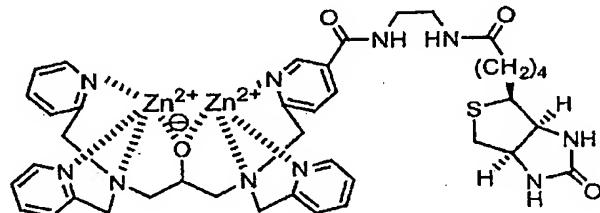
## 【0105】

(製造例2-2) 本発明に係る亜鉛錯体溶液

## 【0106】

## 【化18】

実施例1-5の化合物



## 【0107】

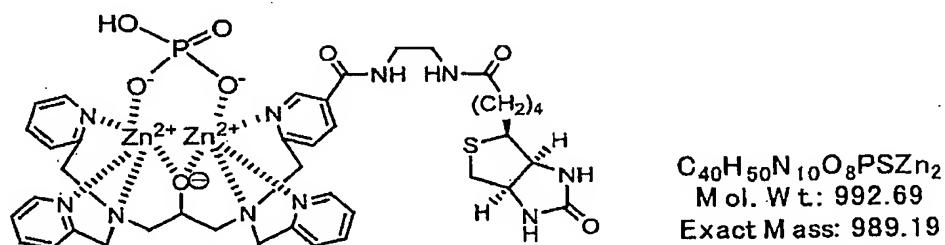
上記製造例2-1で合成した化合物をリン酸緩衝液 (pH = 6.86) に溶解して濃度3mMの溶液とし、2倍モルの硝酸亜鉛を加えた。

## 【0108】

この溶液中で、本発明に係る亜鉛錯体は下に示す構造を有しており、これをMALDI-TOFマススペクトルによって確認した。

## 【0109】

## 【化19】



## 【0110】

MALDI-TOFマススペクトルの結果を、図3として示す。図3中、分子イオンピークは989.56 (exact mass: 989.19) として観測された。

## 【0111】

(試験例1) 10% Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
先ず、以下の条件で電気泳動用ゲル、泳動ゲル用pH緩衝液、とサンプル溶解用色素液

を調製した。

【0112】

濃縮ゲル

125 mM Tris-塩酸 (pH 6.8)

4.5% (w/v) ポリアクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 30:1)

分離ゲル

375 mM Tris-塩酸 (pH 8.8)

10% (w/v) ポリアクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 30:1)

泳動ゲル用 pH 緩衝液 (pH 8.3)

25 mM Tris

190 mM グリシン

サンプル溶解用色素液 (3倍濃縮液)

195 mM Tris-塩酸 (pH 6.8)

10% (w/v) グリセロール

0.1% (w/v) BPP (プロムフェノールブルー:泳動色素マーカー)。

【0113】

次に、1:ウシ血清アルブミン、2:β-カゼイン (リン酸化型)、3:β-カゼイン (脱リン酸化型) それぞれ  $2\ \mu\text{g}$  をサンプル溶解用色素液に溶解して試料とし、これを調製した電気泳動用ゲルにプロットした後、泳動色素マーカーが流れ出るまで 4 mA の定電流電気泳動を行なった。

【0114】

得られたゲルを上記製造例 1-6 で調製した本発明に係る亜鉛錯体溶液 (50  $\mu\text{M}$ ) に約 30 分間浸漬した後、溶液から取り出して、UV ランプを当てつつ写真撮影を行なった。続いて、クマシープリリアントブルーによって通常の染色を行ない、写真撮影した。本発明に係る亜鉛錯体溶液による染色後のゲルを A、続いてクマシープリリアントブルー染色後のゲルを B として図 2 に示す。

【0115】

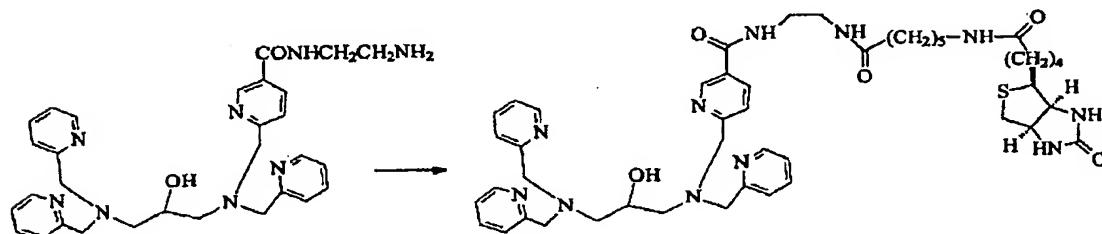
図 2 の通り、本発明方法によれば、リン酸が結合した  $\beta$ -カゼイン (2) のみが特定できる。従って、本発明方法によれば、生体試料からリン酸化されたペプチドのみを特定でき得ることが明らかとなった。

【0116】

(製造例 3-1)

【0117】

【化 20】



【0118】

製造例 1-4 で得た  $N,N,N'$ -トリ(2-ピリジルメチル)- $N'$ -[5- $N'$ -(2-アミノエチル)カルバモイル-2-ピリジルメチル]-1,3-ジアミノプロパン-2-オール 113mg (0.21mmol) のアセトニトリル (10mL) 溶液に、5-(N-スクシンイミジルオキシカルボニル) ペンチル D-ビオチンアミド 95mg (0.21mmol) のジメチルスルホキシド (2mL) 溶液を滴下した。

## 【0119】

室温で6時間反応後、濃縮して得られた粗製品をカラムクロマトグラフィーで精製し、136mgの目的物を得た（収率76%）。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) : δ 1.25-1.32(2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.38-1.47(4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.56-1.67(5H, m, CH<sub>2</sub>), 1.68-1.77(1H, m, CH<sub>2</sub>), 2.11-2.22(4H, m, COCH<sub>2</sub>), 2.58(2H, dd, J=8.0 and 13.3Hz, NCH), 2.66(1H, dd, J=3.9 and 13.3Hz, NCH), 2.68(1H, dd, J=3.9 and 13.3Hz, NCH), 2.71(1H, dd, J=3.0 and 13.3Hz, SCH), 2.88(1H, dd, J=5.2 and 13.0Hz, SCH), 3.07-3.21(3H, m, NCH, SCH), 3.45-3.59(4H, m, NCH<sub>2</sub>), 3.82-3.91(8H, m, NCH<sub>2</sub>Py), 3.94(1H, tt, J=3.9 and 8.0Hz, OCH), 4.28-4.32(1H, m, NCH), 4.46-4.50(1H, m, NCH), 5.62(1H, bs, NHCO), 6.40(1H, bs, NHCO), 6.62(1H, t, J=5.7 Hz, NHCO), 7.10-7.14(3H, m, Py), 7.23(1H, t, J=6.0Hz, NHCO), 7.32-7.36(3H, m, Py), 7.43(1H, d, J=8.2Hz, Py), 7.56-7.61(3H, m, Py), 8.06(1H, dd, J=2.3 and 8.2Hz, Py), 8.17(1H, t, J=5.0Hz, NHCO), 8.46-8.50(3H, m, Py), 8.96(1H, d, J=2.3Hz, Py)

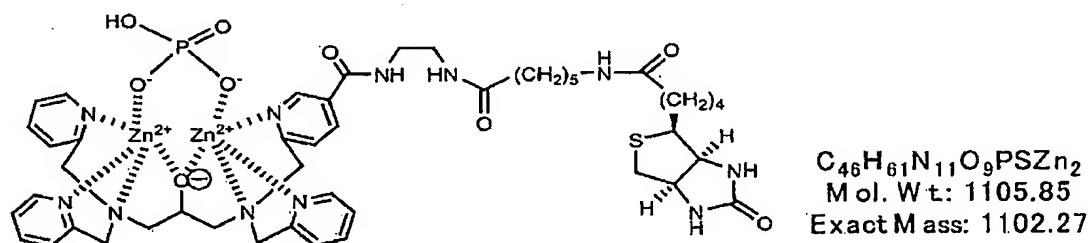
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz) : δ 25.0(CH<sub>2</sub>), 25.5(CH<sub>2</sub>), 26.2(CH<sub>2</sub>), 27.7(CH<sub>2</sub>), 27.8(CH<sub>2</sub>), 29.0(CH<sub>2</sub>), 35.6(CH<sub>2</sub>CO), 36.1(CH<sub>2</sub>CO), 39.0(CH<sub>2</sub>NH), 39.3(CH<sub>2</sub>NH), 40.7(CH<sub>2</sub>S), 41.0(CH<sub>2</sub>NH), 55.6(CH<sub>2</sub>S), 59.2(CH<sub>2</sub>N), 60.2(CHNH), 60.7(CH<sub>2</sub>Py), 60.8(CH<sub>2</sub>Py), 61.0(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Py), 61.8(CHNH), 67.4(CHOH), 122.1(Py), 122.8(Py), 123.2(Py), 128.5(Py), 135.6(Py), 136.5(Py), 148.0(Py), 149.0(Py), 159.3(Py), 159.4(Py), 162.6(Py), 163.9(NC<sub>ON</sub>), 166.3(CONH), 173.4(CONH), 174.9(CONH)。

## 【0120】

(製造例3-2) 本発明に係る亜鉛錯体溶液

## 【0121】

## 【化21】



## 【0122】

上記製造例3-1で合成した化合物(200nmol)をリン酸緩衝液(pH=6.86)に溶解して3mMの溶液とし、2倍モルの硝酸亜鉛を加えた。

## 【0123】

この溶液をMALDI-TOFマススペクトルにより分析することによって、上記亜鉛錯体の存在を確認した。MALDI-TOFマススペクトルの結果を、図4として示す。図4中、分子イオンピークは1102.3(exact mass:1102.27)として観測された。

## 【0124】

## (試験例2)

ストレプトアビジンアガロース(ビオチン結合部位量:60~120nmol/mL)と緩衝液の懸濁液0.3mL(シグマ社製)を遠心式フィルターユニット(容量0.5mL, フィルターポア径0.22μm)に充填し、2000×gで15秒間遠心分離機にかけ、緩衝液を濾過した。次いで、5.0mMトリスアセテート緩衝液(pH=7.4, 0.30mL)をフィルターユニットに担持し、2000×gで15秒間遠心濾過洗浄する操作を5回行なった。

## 【0125】

このフィルターユニットに、製造例3-1で合成した化合物(120nmol/mL)と酢酸亜鉛(500nm/mL)を溶解した5.0mMトリスアセテート緩衝液(pH=7.4, 0.30mL)を担持し、5分間平衡化した後、これを2000×gで15秒間遠心濾過した。次に、5.0mMトリス-

アセテート緩衝液 (pH=7.4, 0.30mL) をフィルターユニットに担持し、2000×gで15秒間遠心濾過洗浄する操作を5回行なった。更に、10nmol/mL酢酸亜鉛を溶解した5.0mMトリスーアセテート緩衝液 (pH=7.4, 0.30mL) をフィルターユニットに担持し、2000×gで15秒間遠心濾過洗浄する操作を5回行なった。

## 【0126】

得られたフィルターユニットに、試料として非リン酸化ペプチドp60c (p60c-src peptide 521-533, 14nmol/mL) およびリン酸化ペプチドP-p60c (0-phosphoryl p60c-src peptide 521-533, 12nmol/mL) を溶解した5.0mMトリスーアセテート緩衝液 (pH=7.4, 0.30mL) を担持し、5分間平衡化した後、2000×gで15秒間遠心濾過し、この濾液をフラクション1とした。

## 【0127】

次に、5.0mMトリスーアセテート緩衝液 (pH=7.4, 0.50M NaNO<sub>3</sub>, 0.30mL) をフィルターユニットに担持し、2000×gで15秒間遠心濾過する操作を3回行なった。それぞれの濾液を、フラクション2, 3, 4とした。

## 【0128】

更に、1.0mMリン酸一水酸化ナトリウム緩衝液 (pH=7.4, 0.50M NaNO<sub>3</sub>, 0.30mL) をフィルターユニットに担持し、2000×gで15秒間遠心濾過する操作を2回行なった。それぞれの濾液を、フラクション5, 6とした。

## 【0129】

上記各フラクションのペプチド含有量を、HPLCで定量した。得られた分離回収率の結果を表1に示す。

## 【0130】

【表1】

フラクションNo.	1	2	3	4	5	6
p60c (%)	67	24	9	0	0	0
P-p60c (%)	0	0	0	0	83	17

## 【0131】

HPLC分析条件：

カラム : Capcell Pak C18 type UG80, 4.6mm φ × 150mm  
 移動相 : アセトニトリル/水=14/86(v/v), 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸  
 流速 : 1mL/min  
 カラム温度 : 40°C  
 検出方法 : UV 266nm  
 保持時間 : P-p60c 5.3分, p60c 13.4分。

## 【0132】

上記結果より、本発明の錯体化合物を用いれば、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの混合試料から、リン酸化ペプチドを選択的に分離できることが実証された。

## 【0133】

(比較例1)

ストレプトアビジンアガロース (ビオチン結合部位量: 60~120nmol/mL) と緩衝液の懸濁液0.3mL (シグマ社製) を、遠心式フィルターユニット (容量0.5mL, フィルターポア径0.22μm) に充填し、2000×gで15秒間遠心分離機にかけ、緩衝液を濾過した。次いで、5.0mMトリスーアセテート緩衝液 (pH=7.4, 0.30mL) をフィルターユニットに担持し、2000×gで15秒間遠心濾過洗浄する操作を5回行なった。

## 【0134】

得られたフィルターユニット (本発明の錯体化合物は無し) について、上記試験例2と

出証特2004-3117048

同様の試料を用いて同様の処理を行ない、フラクション7～12を得た。

【0135】

得られたフラクション7～12につき、上記試験例2と同様の条件でHPLC分析を行なった。結果を表2に示す。

【0136】

【表2】

フラクションNo.	7	8	9	10	11	12
p60c (%)	75	20	5	0	0	0
P-p60c (%)	83	17	0	0	0	0

【0137】

当該結果より、本発明の錯体化合物を用いなければ、同様の処理を行なってもリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドを分離できないことが明らかにされた。

【図面の簡単な説明】

【0138】

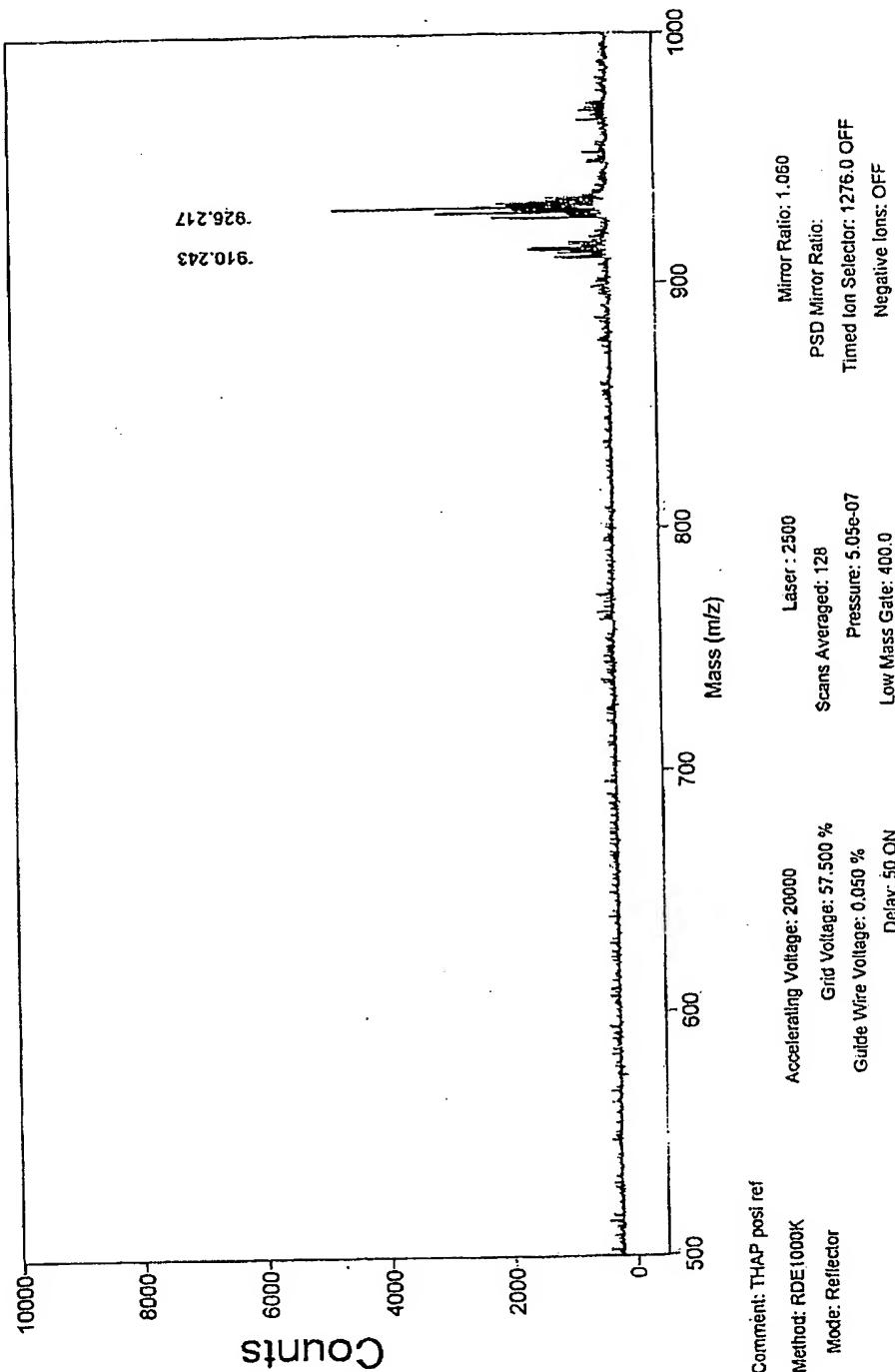
【図1】本発明に係る亜鉛錯体のMALDI-TOFマススペクトル

【図2】電気泳動後における染色結果の比較

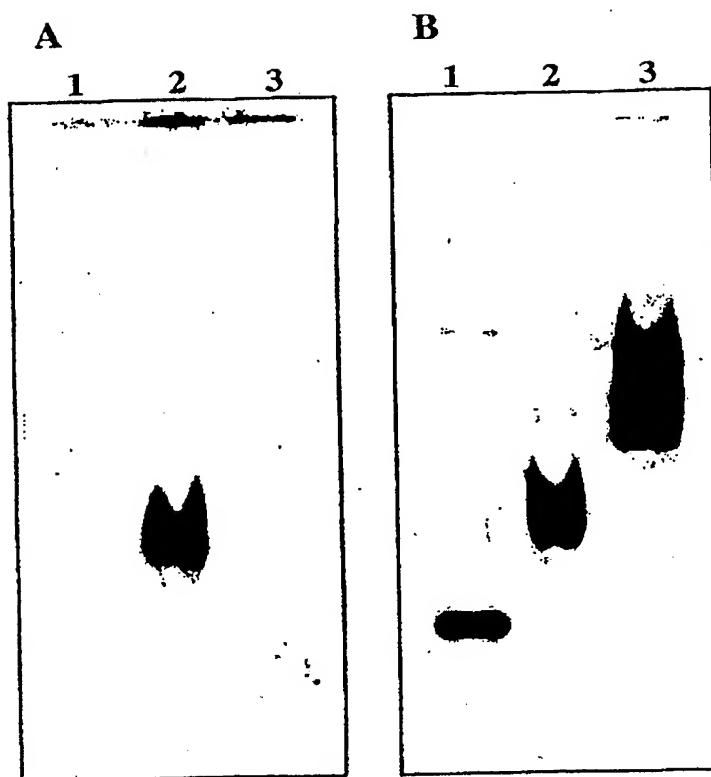
【図3】本発明に係る亜鉛錯体のMALDI-TOFマススペクトル

【図4】本発明に係る亜鉛錯体のMALDI-TOFマススペクトル

【書類名】 図面  
【図 1】

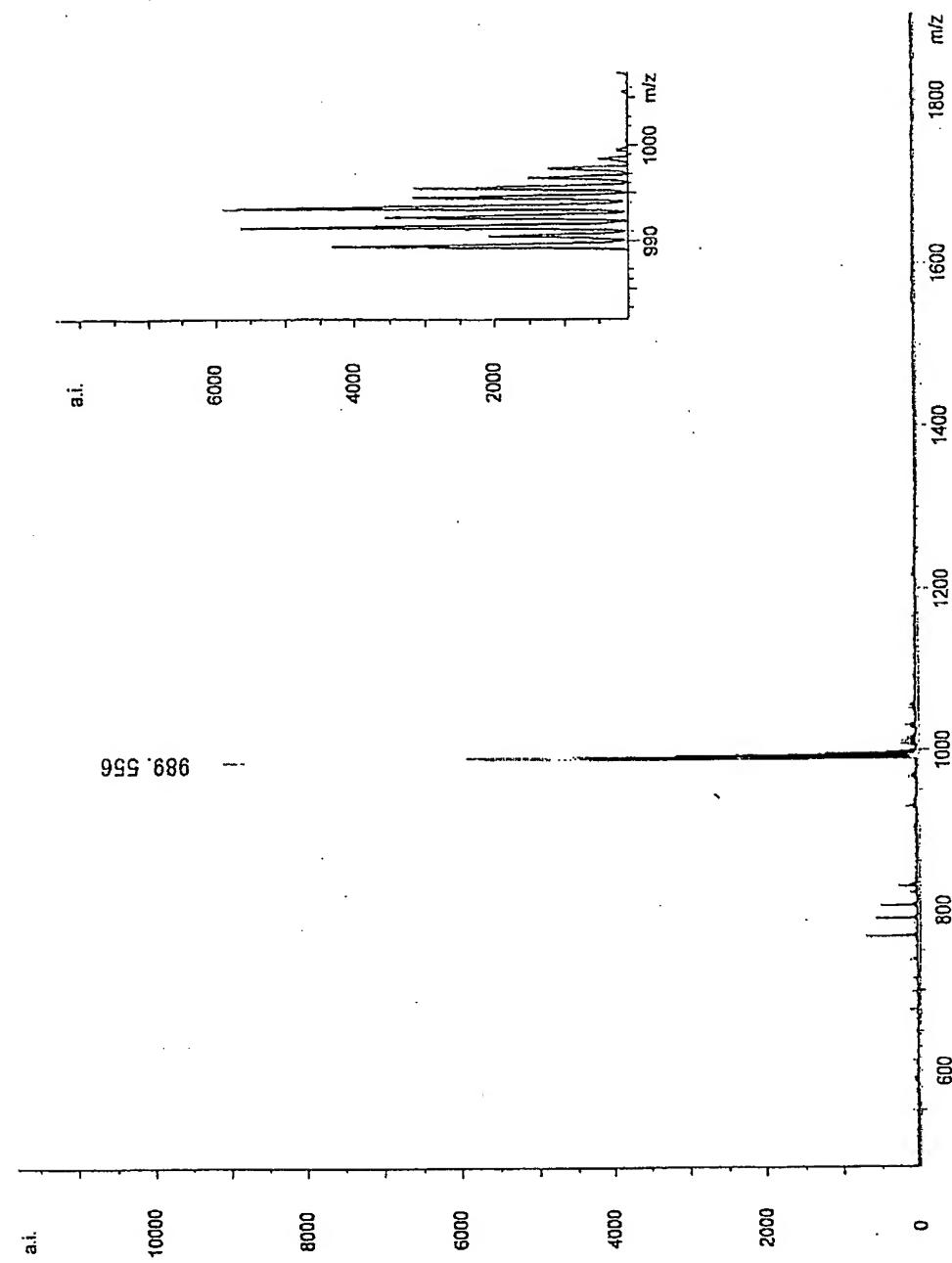


【図 2】

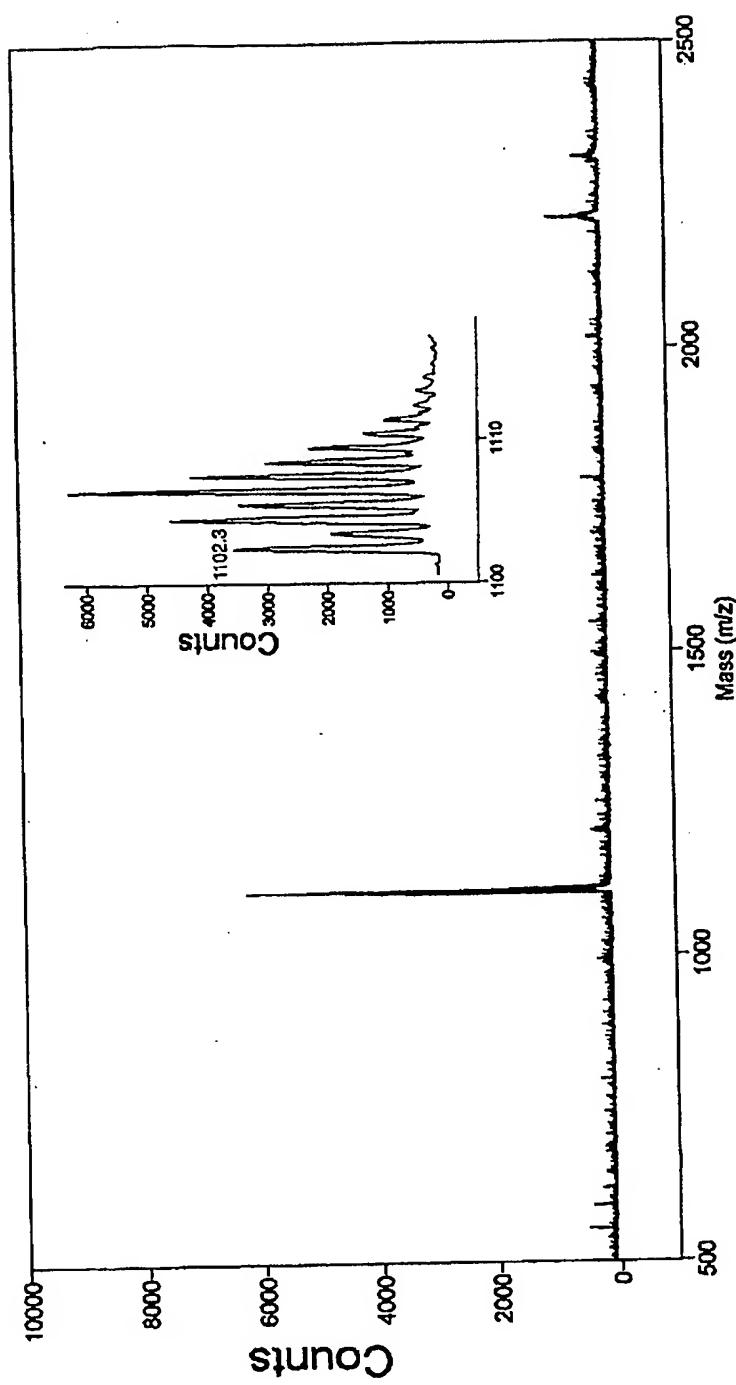


出証特 2004-3117048

【図 3】



【図4】



出証特 2004-3117048

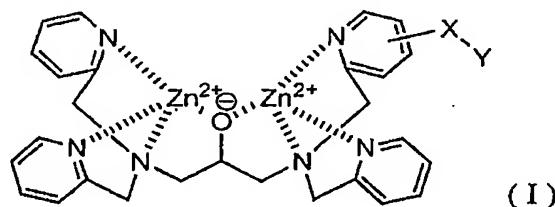
【書類名】要約書

【要約】

【課題】 生体試料等からリン酸化ペプチド（タンパク質）を容易に検出できる方法、およびリン酸化ペプチドに高い配位結合能を有することから、当該方法で使用でき得る化合物を提供する。

【解決手段】 式（I）で表わされる錯体化合物を開示する。

【化1】



[式中、Xは結合基を示し、Yは標識基を示す。]

化合物（I）は、リン酸化ペプチドに高い配位結合能を有し且つ標識基を有することから、リン酸化ペプチドを容易に特定することができる。

特願 2003-356934

出願人履歴情報

識別番号

[000134637]

1. 変更年月日

1991年 4月15日

[変更理由]

住所変更

住 所

兵庫県尼崎市西長洲町2丁目6番1号

氏 名

株式会社ナード研究所